



TITLE:

Studies on Structure-Function Relationship and Conversion of Coenzyme Requirement in Bacterial α -Keto Acid Reductases Responsible for Metabolism of Acidic Polysaccharides(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Takase, Ryuichi

CITATION:

Takase, Ryuichi. Studies on Structure-Function Relationship and Conversion of Coenzyme Requirement in Bacterial α -Keto Acid Reductases Responsible for Metabolism of Acidic Polysaccharides. 京都大学, 2015, 博士(農学)

ISSUE DATE:

2015-05-25

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k19195>

RIGHT:

学位規則第9条第2項により要約公開; 許諾条件により本文は2016-07-04に公開

(続紙 1)

京都大学	博士（農学）	氏名	高瀬 隆一
論文題目	Studies on Structure-Function Relationship and Conversion of Coenzyme Requirement in Bacterial α -Keto Acid Reductases Responsible for Metabolism of Acidic Polysaccharides (酸性多糖の代謝に関わる細菌 α -ケト酸還元酵素の構造機能相関と補酵素要求性変換に関する研究)		
(論文内容の要旨)			
<p>NADP(H)とNAD(H)は、酸化還元に関わる酵素反応において、電子の授受に関わる重要な補酵素である。これらの補酵素を用いて、糖、脂肪酸、ステロイドなどを代謝するshort-chain dehydrogenase/reductase (SDR) ファミリーが、細菌からヒトに至るまで広範な生物に存在する。NADP(H)とNAD(H)の相違はアデニル酸リボース2'位のリン酸基の有無であり、多くの酸化還元酵素はこれらの補酵素を区別して用いている。これまでに、微生物を用いて種々の有用物質が生産されているが、外来遺伝子の導入やゲノム遺伝子の欠失変異により細胞内補酵素バランスが崩れ、有用物質の生産量が制限されることがある。その対処法として、補酵素要求性に変換された酵素の遺伝子を導入することにより、細胞内補酵素バランスを改善させて、生産量の向上を目指す事例が報告されている。しかし、野生型と同等の酵素活性を保ったまま補酵素要求性を変換することは概して困難であり、普遍的な方法論が求められている。また、近年、多くの酵素の立体構造が決定され、その構造機能相関が解明されているが、構造データに基づいた機能向上や改変を可能とする方法論の構築に関する研究は乏しい。</p> <p>アルギン酸は、褐藻類に多く含まれる酸性多糖である。グラム陰性<i>Sphingomonas</i>属細菌A1株は、エンド型とエキソ型アルギン酸リアーゼの作用によりアルギン酸を単糖（不飽和ウロン酸）にまで分解する。生じた単糖は非酵素的に開環し、α-ケト酸である4-deoxy-L-erythro-5-hexoseulose uronic acid (DEH) となる。これまで、<i>Pseudomonas</i>属細菌においてDEH還元酵素の存在は知られていたが、その実体は不明である。</p> <p>本論文は、微生物が種々の酸性多糖を代謝する際に生じる不飽和ウロン酸（α-ケト酸）を還元するSDRファミリーに焦点を当て、(i) A1株における互いに異なる補酵素要求性を示す二種類のDEH還元酵素の同定とそれらの立体構造の解明、(ii) α-ケト酸還元酵素の補酵素要求性に関わる構造要因の決定、並びに(iii) 構造情報に基づいた補酵素要求性の変換技術の確立など、微生物代謝学、酵素生化学、および構造生物学の観点からSDRファミリーの構造機能相関を解析し、補酵素要求性を制御する方法論を確立したものである。本論文は以下のように要約される。</p> <p>第一章では、A1株におけるDEH還元酵素とその遺伝子を同定し、本酵素の立体構造を決定した。A1株細胞抽出液からDEH還元酵素A1-Rを精製し、ペプチドマスフィンガープリンティングによりA1-R遺伝子を同定した。A1-Rは、一次構造に基づいてSDRファミリーに分類され、NADPH存在下でDEHより2-keto-3-deoxy-D-gluconic acid (KDG) を生成する。A1-RとA1-R/NADP⁺複合体の各立体構造を、X線結晶構造解析により決定した。A1-Rは、他のSDRファミリーと同様、$\alpha/\beta/\alpha$の三層からなる基本骨格をもつ。また、補酵素結合モチーフとして知られるRossmann fold部位にNADP⁺が結合していた。</p>			

第二章では、A1株にA1-Rと異なる補酵素（NADH）要求性を示すDEH還元酵素A1-R'を見出し、A1-R'とA1-Rの比較構造解析に基づいて、補酵素要求性を変換する方法論を示した。A1-R'とA1-Rは一次構造上高い同一性（64%）を示すが、補酵素要求性が異なる。A1-R'とA1-R'/NAD⁺複合体の各立体構造を決定した。A1-R'も $\alpha/\beta/\alpha$ の三層構造からなる。A1-R'とA1-Rにおいて、補酵素のアデニル酸リボース2'位結合部位を比較すると、空間的および電荷的差異が認められた。該当部位に違いをもたらした残基は、いずれも長短二本のループに含まれていた。ループをそれぞれ交換した変異体（ex_W）を作製し、それらの速度パラメーターを決定した。その結果、得られたA1-R'およびA1-R変異体では、各々補酵素要求性が互いに交換されていた。さらに、変異体A1-R'_ex_WのNADPHに対する k_{cat}/K_m は、野生型A1-RのNADPHに対する k_{cat}/K_m よりも2倍高い値を示した。

第三章では、DEH還元酵素に見出した二本のループの特性と補酵素要求性との相関が、SDRファミリーに広く保存されていることを明らかにした。酸性多糖ペクチンとグリコサミノグリカンの代謝に関わる各酵素KduDとDhuDは、2,5-diketo-3-deoxy-D-gluconic acidを還元しKDGに変換する。両酵素はNADH要求性を示すが、KduDはNADPHも利用できる。KduDとDhuDの立体構造を決定した結果、KduDの両補酵素利用能に関わる構造要因を明らかにした。補酵素のアデニル酸リボース2'位結合部位に関して、KduDはA1-RとA1-R'における該当空間の中間程度の容積を有しており、リン酸基と静電的に反発しない無荷電性を示した。

上記の結果に基づいて、本研究で、SDRファミリーにおいて補酵素要求性を決定する構造要因を明らかにし、立体構造に基づいて補酵素要求性を制御することを可能にする方法論を確立した。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(論文審査の結果の要旨)

細菌において、アルギン酸由来不飽和ウロン酸 (α -ケト酸: DEH) に作用する初発酵素の実体は不明である。NADHとNADPHとの構造類似性 (アデニル酸のリボース2'位: リン酸基の有無) にもかかわらず、酸化還元酵素における補酵素要求性の変換例は極めて少ない。本論文は、酸性多糖から生じる α -ケト酸を還元するSDRファミリーに焦点を当て、異なる補酵素要求性を示す還元酵素の分子特性と構造機能相関を解析し、補酵素要求性を決定する構造要因および補酵素要求性の変換法を明らかにした一連の研究をまとめたものである。評価すべき主要な点は以下の三つに要約される。

1. アルギン酸資化性*Sphingomonas*属細菌A1株において、それぞれNADPHとNADH要求性を示すDEH還元酵素A1-RとA1-R'を同定し、それらの酵素学的特性と立体構造を明らかにした。
2. A1-RとA1-R'の各補酵素結合型酵素の比較構造解析により、補酵素のアデニル酸リボース2'位結合部位の空間と電荷を決定する二本のループを特定し、A1-RとA1-R'のループを互いに交換することで補酵素要求性を変換した。
3. ペクチンとグリコサミノグリカン由来 α -ケト酸に作用する二種類の還元酵素KduDとDhuDの立体構造を決定した。両酵素の一次および三次構造解析により、SDRファミリーにおいて二本のループ構造と補酵素要求性との間に相関を見出した。

以上のように本論文は、酸性多糖の代謝に関わる α -ケト酸還元酵素の分子同定とそれらの構造機能相関の解析により、補酵素要求性に関わる二本のループの構造特性を明らかにし、 α -ケト酸還元酵素における補酵素要求性を変換する方法論を確立したものであり、微生物生産学、酵素科学、糖質科学、構造生物学および生物機能変換学の発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士(農学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成27年4月9日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士(農学)の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。

また、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日: 年 月 日以降 (学位授与日から3ヶ月以内)